

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-318492

(43)Date of publication of application : 24.11.1999

(51)Int.Cl.

C12Q 1/28
G01N 21/76
G01N 33/532
G01N 33/536

(21)Application number : 10-376986

(71)Applicant : AISIN SEIKI CO LTD

(22)Date of filing : 28.12.1998

(72)Inventor : FUJITA SATOSHI
KAGIYAMA NAOTO
KONDO YASUMITSU
PAIDI IERA REDDIE
YU TAKESHI

(30)Priority

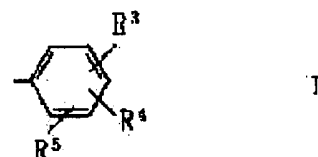
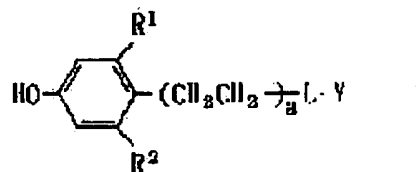
Priority number : 10 73094 Priority date : 09.03.1998 Priority country : JP

(54) COMPOSITION CONTAINING FLUOROGENIC SUBSTRATE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject substrate-containing composition having excellent deposition on a biological sample, useful for detecting a biological specimen, by preparing a composition containing a fluorogenic substrate composed of a specific phenol compound.

SOLUTION: This composition contains a fluorogenic substrate (or a fluorescent coloring matter precursor) of formula I [R1 and R2 are each H or an electron donating group such as a lower alkyl, a lower alkoxy, OH, an alkynylcarbonyloxy, a di-lower alkyl-substituted amino, an aryl or the like; L is NHCO or CONH; Y is a group of formula II (R3 to R5 are each as shown for R1 or carboxyl or an atomic group in which two substituent groups of R3 to R5 form a 5-membered to 6-membered hydrocarbon ring with carbon atoms adjoined to the substituent groups) or a 1-6C alkylene-COOH; (a) is 0 or 1], forms a fluorescent coloring matter under an oxidizing reaction condition and is useful for detecting a biological specimen.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.11.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of

rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-318492

(43) 公開日 平成11年(1999)11月24日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 Q 1/28		C 1 2 Q 1/28
G 0 1 N 21/76		G 0 1 N 21/76
33/532		33/532 B
33/536		33/536 D

審査請求 未請求 請求項の数11 F D (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平10-376986	(71) 出願人	000000011 アイシン精機株式会社 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地
(22) 出願日	平成10年(1998)12月28日	(72) 発明者	藤田 聡 愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会 社アイシンコスモス研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平10-73094	(72) 発明者	鍵山 直人 愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会 社アイシンコスモス研究所内
(32) 優先日	平10(1998)3月9日	(72) 発明者	近藤 恭光 愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会 社アイシンコスモス研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 小田島 平吉 (外2名) 最終頁に続く

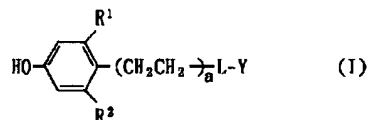
(54) 【発明の名称】 蛍光発生性基質を含有する組成物

(57) 【要約】

【課題】 生物学的試料への沈着性にすぐれた蛍光色素を形成しうる蛍光発生性基質の提供

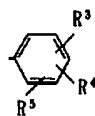
【解決手段】 式

【化1】



(式中、Lは-NHCO-または-CONH-であり、
Yは

【化2】



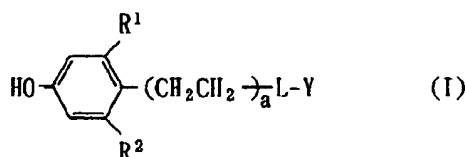
または-Alkylene-COOHであり、aは0または1であり、R1~R5は、水素原子または置換基である)の
蛍光発生性基質を含有する蛍光色素形成用組成物。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(I)

【化1】

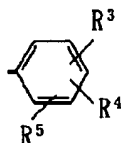


(式中、R¹およびR²は、相互に独立して、水素原子または低級アルキル基、低級アルコキシ基、水酸基、アルキルカルボニルオキシ基、ジ-低級アルキル置換アミノ基およびアリール基からなる群より選ばれる電子供与基を表し、

Lは、-NHCO-または-CONH-を表し、

Yは、

【化2】



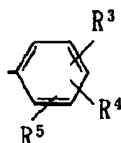
あるいは、-Alkylene-COOHを表し、

ここで、R³、R⁴ およびR⁵ は、相互に独立して上記R¹ およびR² について定義した基またはカルボキシル基であるか、あるいはR³、R⁴ およびR⁵ のうちの2つの置換基は、それらが結合した隣接する炭素原子と一緒に、5員もしくは6員の炭化水素環を形成する原子団であり、Alkyleneは直鎖もしくは分枝のC₁₋₆アルキレンであり、

aは0または1の整数を表す)の蛍光発生性基質(または蛍光色素前駆体)を含むことを特徴とする酸化反応性環境下で蛍光色素を形成するための組成物。

【請求項2】 式(I)のLが、-NHCO-であり、Yが

【化3】



であり、そしてaが0である請求項1記載の組成物。

【請求項3】 式(I)のLが-NHCO-であり、YがAlkylene-COOHであり、そしてaが1である請求項1記載の組成物。

【請求項4】 酸化反応性環境が、ペルオキシダーゼと過酸化水素の反応系である請求項1ないし3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】 酸化反応性環境が固体支持体に結合したペルオキシダーゼと過酸化水素の反応系である請求項4

記載の組成物。

【請求項6】 固体支持体が生物学的試料であり、そしてペルオキシダーゼが免疫複合体の形成を介して該生物学試料に結合した請求項5記載の組成物。

【請求項7】 生物学的試料が染色体、細胞または生物体の組織である請求項6記載の組成物。

【請求項8】 固体支持体が核酸が固定された多孔質担体または重合体膜であり、ペルオキシダーゼが免疫複合体の形成および核酸アプローブと前記核酸とのハイブリダイゼーションを介して該支持体に結合した請求項5記載の組成物。

【請求項9】 被検体の存在が疑われる生物学的試料を用意し、

過酸化水素が存在する状態で前記試料にペルオキシダーゼを共存させ、さらに請求項1記載の式(I)の蛍光発生性基質の存在下で酵素反応を行い、

こうして形成される蛍光色素に基づく蛍光を測定して得られる蛍光の強度を被検体の存否または被検体の濃度の指標として評価する、ことを特徴とする被検体の検出方法。

【請求項10】 ペルオキシダーゼが免疫複合体の形成を介して固形の生物学的試料に結合した形態にある請求項9記載の検出方法。

【請求項11】 試料中の被検体が核酸であり、該核酸が生物学的試料中に存在するものであり、そしてペルオキシダーゼが免疫複合体の形成および核酸アプローブと前記試料中の核酸とのハイブリダイゼーションを介して結合した形態にある請求項9記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、蛍光発生性基質(または蛍光色素前駆体)を含有する組成物に関し、特に、生物学的被検体を検出するのに有用な組成物、ならびに生物学的被検体の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生物学的な被検体を検出する技術分野では、従来より、放射性同位体、発色性基質ならびに蛍光色素および蛍光色素の前駆体(または蛍光発生性基質)が広く利用されてきた。蛍光発生性基質は、特に、固相酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay)において、標識酵素として、アルカリ性ホスファターゼやペルオキシダーゼを用いる場合の基質として、現に使用されまたは使用することが広く検討されている。

【0003】ペルオキシダーゼと過酸化水素の反応系で使用されている蛍光発生性基質(または蛍光発生性化合物)の具体的なものとしては、2',7'-ジクロロフルオレセイン(A. S. Ferrer, et al., Anal. Biochem. 187, 129 (1990))が挙げられる。また、前記反応系で、一般的に、蛍光発生性基質より感度が低下するものの、発色安定性の観点からジアミノベンジジ

ン誘導体を初めとする発色性基質もよく使用されている(例えば、P. D. Josephy, et al., J. Biol. Chem., 258, 5561 (1983); E. Sheldon, et al., Clin. Chem., 33, 1368 (1987))。

【0004】その他、比較的簡単な構造を有し、ペルオキシダーゼと過酸化水素の反応系で働く蛍光発生性基質のうち、興味深いものとしては、K. Zaitsev, et al., Anal. Biochem., 109, 109~113 (1980)に記載されている3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、特公平7-108238号公報に記載されているN-アルキルカルボニル-p-ヒドロキシアニリド類、やS. Fujita, et al., の Chemistry Letters, 1075-1076 (1997)に記載されているN-アロイル-p-アミノアニリド類が挙げられる。

【0005】これらの蛍光発生性基質の使用は、それぞれ一定の目的を達成するものである。しかしながら、特に、かような基質の存在下でペルオキシダーゼと過酸化水素の反応を固形の生物学的試料上で行い、形成される蛍光色素を該試料上に沈着せしめる場合には、例えば、該色素の水溶性媒体への比較的高い溶解性等に起因し、蛍光を発する領域が拡がり、高解像度での測定が必ずしも容易でない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前述のような従来技術の蛍光発生性基質に随伴する、特に固形の生物学的試料上で使用する際の短所を改善した新たな手段を提供することを目的とする。具体的には、本発明の目的は蛍光発生性基質から形成される蛍光色素の固体支持体上での可動性を低減することのできる前記基質の提供、およびその使用方法の提供にある。

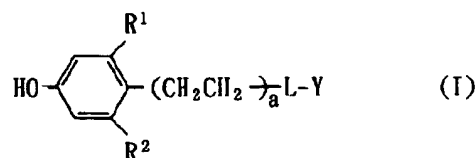
【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ペルオキシダーゼと過酸化水素の反応系での各種化合物の挙動について検討してきたところ、上記3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸に比べそれ自体水に対する溶解性が低減した各種p-ヒドロキシフェニル誘導体上記反応系で水に対して実質的に不溶性の蛍光色素を形成し、しかもかような色素は固形の生物学的試料上での可能性が極めて低いことを見出した。

【0008】したがって、上記課題は、本発明に従う、下記式(I)で示される蛍光発生性基質(または蛍光色素前駆体)を含むことを特徴とする酸化反応性環境下で蛍光色素を形成するための組成物が提供される。

【0009】

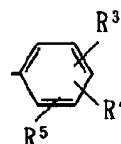
【化4】



【0010】上式中、R¹およびR²は、相互に独立して、水素原子または低級アルキル基、低級アルコキシ基、水酸基、アルキルカルボニルオキシ基、ジ-低級アルキル置換アミノ基およびアリール基からなる群より選ばれる電子供与基を表し、Lは、-NHCO-または-CONH-を表し、Yは、

【0011】

【化5】



【0012】あるいは、-Alkylene-COOHを表し、ここで、R³、R⁴およびR⁵は、相互に独立して上記R¹およびR²について定義した基またはカルボキシル基であるか、あるいはR³、R⁴およびR⁵のうちの2つの置換基は、それらが結合した隣接する炭素原子と一緒に、5員もしくは6員の炭化水素環を形成する原子団であり、Alkyleneは直鎖もしくは分枝のC₁₋₆アルキレンであり、aは0または1の整数を表す。

【0013】また、もう一つの態様の本発明として、被検体の存在が疑われる生物学的試料を用意し、過酸化水素が存在する状態で前記試料にペルオキシダーゼを共存させ、さらに上記式(I)の蛍光発生性基質の存在下で酵素反応を行い、こうして形成される蛍光色素に基づく蛍光を測定して得られる蛍光の強度を被検体の存否または被検体の濃度の指標として評価する、ことを特徴とする被検体の検出方法も提供される。

【0014】

【発明の具体的な態様】本発明にいう、蛍光発生性基質とは、酸化反応性環境下、例えば、ペルオキシダーゼと過酸化水素の反応系において酸化された結果、分子間で何等かの共有結合を形成して蛍光色素を生成しうる化合物を意味する。さらに、本発明で用いる場合の蛍光色素の語は、放射光を吸収したときに蛍光を発する化合物だけでなく、蛍光の発光が十分な強度を有さないが、分光学的手段により検出できる、ある一定の発色色素をも包含する概念である。

【0015】式(I)のR¹およびR²の定義において、低級アルキル基および低級アルコキシにおけるアルキル部分は、炭素原子1~6個の直鎖または分岐鎖のアルキル、を意味する。かようなアルキルの具体的なものとしては、メチル、エチル、n-プロピル、iso-プロ

ロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、*tert*-ペンチルおよび*n*-ヘキシル等が挙げられる。これらの中で、メチルが特に好ましい。

【0016】アリール基は、場合によって、水酸基、ハロゲン、低級アルキル、低級アルコキシによって置換されている、フェニル、トリルおよびナフチルであり、特にフェニルが好ましい。

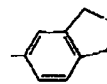
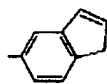
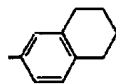
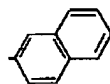
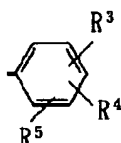
【0017】 R^1 および R^2 は、少なくともいずれか一方が水素原子であることが好ましく、 R^1 または R^2 の両者が水素原子以外の場合、それらは、メチル基またはメトキシ基であることが好ましい。

【0018】 L は、 $-NHCO-$ または $-CONH-$ を表し、これらの連結基は、記載されている方向性を有して式(1)の他の部分と結合する。

【0019】 Y は、

【0020】

【化6】



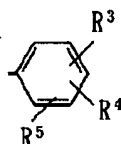
【0024】であることができる。

【0025】基-Alkylene-COOHにおける-Alkylene-の具体的なものとしては、限定されるものでないが、メチレン、エチレン、トリメチレン、プロピレン、テトラメチレン、イソプロピルメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、2-イソプロピルトリメチレンを挙げることができる。これらのうち、ペンタメチレンおよびヘキサメチレンが好ましい。

【0026】上記各部分の組み合わせの好ましいものとしては、 a が0のとき、 L が $-NHCO-$ であり、そして Y が

【0027】

【化8】



【0028】であるか、あるいは a が1のとき、 L が $-CONH-$ であり、そして Y が-Alkylene-COOHであることが好ましい。

【0029】これらの化合物の一部は既知化合物であり、それ自体既知の方法で製造することができるが、新規の化合物であっても当業者であれば、例えば後述する

【0021】(ここで、 R^3 、 R^4 および R^5 は、相互に独立して上記 R^1 および R^2 について定義した基またはカルボキシ基であるか、あるいは R^3 、 R^4 および R^5 のうちの2つの置換基は、それらが結合した隣接する炭素原子と一緒にあって5員もしくは6員の炭化水素環を形成する原子団である)を表すか、あるいは-Alkylene-COOH

(ここで、Alkyleneは直鎖または分枝の C_{1-6} アルキレンである)を表す。

【0022】 R^3 、 R^4 および R^5 は、本発明の目的に沿う限り、それらがベンゼン環のどの位置の炭素原子に結合していてもよいが、嵩高い置換基の場合には連結基 L の結合位置に対してパラ(*p*-)位に結合していることが好ましい。 R^3 、 R^4 および R^5 のうちの2つの置換基はそれらが結合する隣接する炭素原子と一緒にあって、5員もしくは6員の炭化水素環を形成する場合、この環はそれが結合するベンゼン環と縮合環を形成し、例えば、その縮合環は

【0023】

【化7】

製造例に示す方法に従って製造できるであろう。

【0030】本発明で用いる式(1)の

-ヒドロキシフェニル誘導体は、酸化反応性環境下でそのヒドロキシ基に対してオルト位において分子間で共有結合して、二量体化または三量体化し蛍光色素を形成するものと推測される。こうして形成された蛍光色素は、一般的に水性媒体に難溶性である上に、ポリウレタン等の合成樹脂製の多孔質担体または一定のナイロンメンブレン、ニトロセルロースメンブレン、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)メンブレン等の合成樹脂膜、細胞調製物中の染色体、組織それ自体等の固形の生物学的試料等に対して沈着性(または親和性)があり、さらにはそれらの固体支持体上に核酸が担持されている場合には、より優れた沈着性を示す。

【0031】本発明に従う組成物は、一般的に、適当な溶媒と共に式(1)の蛍光発生性基質を含有する。該基質は溶液状態または懸濁液状態で存在することができるが、必要により、水混和性有機溶媒、例えば、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル等を共溶媒とする水性媒体に溶解した状態で存在するのが好ましい。

【0032】本発明にいう酸化反応性環境は、式(1)の蛍光発生性基質を蛍光色素に転化しうるものであれば、いかなる条件であってもよいが、好ましくはペルオキシダーゼと過酸化水素の反応系である。ペルオキシダー

ーゼの代表的なものとしては、西洋ワサビペルオキシダーゼを挙げることができる。

【0033】固体支持体に結合したペルオキシダーゼという場合、固体支持体の語は、例えば、上述のポリウレタン等の合成樹脂製の多孔質担体、ナイロン、ニトロセルロース、PVDF等の合成樹脂製の膜、さらには生物学的試料、より具体的には、組織化学的研究用に調製された動物または植物の組織切片細胞調製物、染色体または組織細胞等を包含する該念である。このような支持体に結合したペルオキシダーゼは、一般的に、前記多孔質担体や重合体膜上に担持されたか、または生物学的試料上に存在する、例えば、核酸(DNA、RNA)に、必要があれば、核酸プローブ、パプテン等を介する、複合体を介して結合しているペルオキシダーゼを意味する。例えば、支持体上の抗原または抗体が存在する場合、抗原-ペルオキシダーゼ標識抗体、抗体-抗原-ペルオキシダーゼ標識抗体、また、DNAもしくはRNAはそれ自体前記抗原となりうるが、支持体上にDNAもしくはRNAが存在する場合、例えばDNAもしくはRNA-(ハイブリダイズ)-ジゴキシゲニン標識DNAプローブ-ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体の形態で結合することができる(ここで、単に一で表示している場合は免疫複合体形成結合を意味し、-(ハイブリダイズ)-は、DNAもしくはRNAとDNAプローブの相補的配列間のハイブリダイゼーションによる結合を意味する)。本発明で用いる式(1)の化合物から形成される蛍光色素は、上述のとおり、固体支持体それ自体または固体支持体に担持された核酸と高い親和性を示すので、固体支持体に結合したペルオキシダーゼと過酸化水素の酵素反応系に、式(1)の化合物を共存させて反応を進行させれば、イン・サイチュー(in situ)で生成した蛍光色素を支持体またはそれに担持された核酸に沈着させることができる。したがって、本発明の組成物は、特に、イン・サイチューでの蛍光免疫測定にお

いて有利に使用できる。しかしながら、例えば、臨床上重要な化合物であるグルコース、尿素、アミノ酸等からグルコースオキシダーゼ、尿酸オキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ等により生成される過酸化水素の測定等における式(1)の蛍光発生性基質としての使用を排除するものでない。

【0034】こうして、本発明の組成物は、生物学的試料中の特定物質(被検体)の検出に使用することができる。かような生物学的試料には、動物の血液、尿などの体液、あるいは動物もしくは植物の組織標本等の組織切片が挙げられる。また、このような試料中に存在する可能性のある、糖、脂質、アミノ酸、核酸、タンパク質等が検出することのできる被検体となりうる。これらの被検体の検出は、一般的に、それ自体既知の免疫測定法を用いるのが好都合であり、また、組織標本中の核酸やタンパク質(例えば、受容体)は、ペルオキシダーゼで標識した適当な抗体を用いて行うことができる。殊に、核酸は、式(1)の化合物を、ペルオキシダーゼ(固体支持体に結合されていなくてもよい)と過酸化水素を用いる反応系で処理し、イン・サイチューで、生成した蛍光色素を核酸に沈着させることにより、検出してもよい。

【0035】蛍光色素は一定の励起光を照射して発生する蛍光エネルギーを測定することにより、蛍光色素の定性的または定量的な検出ができる。定量に際しては、蛍光エネルギーの強度を被検体の存在量の指標として評価することもできる。蛍光エネルギーは、市販の適当な検出器を用いて測定すればよい。

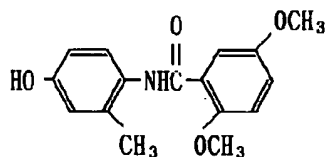
【0036】

【実施例】以下、製造例および実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

【0037】製造例1: 4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-2,5-ジメトキシベンズアミド

【0038】

【化9】



(化合物 1)

【0039】(1) 塩化2,5-ジメトキシベンゾイルの合成

30ml二口フラスコに2,5-ジメトキシ安息香酸(643mg、3.53mmol)を入れ、アルゴン置換後、乾燥塩化メチレン1mlを加えて溶解させた。次いで、塩化チオニル(0.5ml、7.05mmol)を70℃で5時間加熱還流した。次いで溶媒を減圧留去(アスピレーター)した。

【0040】(2) 4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-2,5-ジメトキシベンズアミドの合成

30mlナスフラスコに4-アミノ-3-メチルフェニール(304mg、2.47mmol)を入れ、アルゴン置換後、乾燥ジメチルホルムアミド10mlを加え溶解させた後、塩化2,5-ジメトキシベンズクロライド(708mg、3.53mmol)のDMF溶液(2ml)を加え、室温で12時間攪拌した。反応後、冷水75mlに反応溶液を注ぎ、吸引ろ過後、塩化メチレンで抽出し、水で洗浄後、塩化メチレン層を硫酸ナトリウムで脱水し、塩化メチレンを減圧留去した。次いで、カラムクロマトグラフィー(シリカゲル; 塩化メチレンで流

出) 精製を行うと目的物の4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-2,5-ジメトキシベンズアミドを302mg (収率43%) で得た。

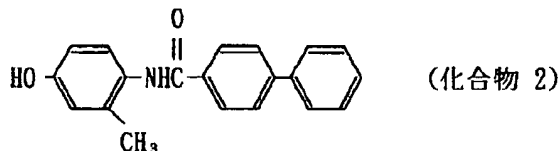
【0041】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ 2.21 (3H, s), 3.76 (3H, s) 3.93 (3H, s) 6.59 (1H, dd, J=2.7 および 8.5) 6.65 (1H, d, J=2.5) 7.08 (1H, dd, J=3.0 および 9.0) 7.15 (1H, d, J=9.0) 7.44 (1H,

d, J=2.7) 7.57 (1H, d, J=8.5) 9.17 (1H, s) 9.63 (1H, s)。

【0042】製造例2: 4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-4-フェニルベンズアミド

【0043】

【化10】



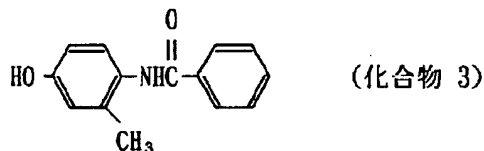
【0044】30ml ナスフラスコに4-アミノ-3-メチルフェノール (270mg, 2.20mmol) を入れ、アルゴン置換後乾燥DMFを1.0ml 加え溶解させた。次いで、乾燥トリエチルアミン0.3ml (1eq) を加えた。次いで、塩化4-フェニルベンゾイル (478mg) の乾燥DMF溶液 (3.0ml) を加え、室温で12時間攪拌した。反応後、冷水100ml に反応溶液を注ぎ、吸引ろ過後、塩化メチレンで抽出し、水で洗浄後、塩化メチレン層を硫酸ナトリウムで脱水し、塩化メチレンを減圧留去した。次いで、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル; 塩化メチレンで流出) 精製を行うと目的物の4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-4-フェニルベンズアミドを648mg (収率96%) で得た。

【0045】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ 2.14 (3H, s) 6.61 (1H, dd, J=2.7 および 8.4) 6.68 (1H, d, J=2.5) 7.08 (1H, d, J=8.4) 7.38~7.55 (3H, m) 7.73~7.83 (4H, m) 8.06 (2H, d, J=8.2) 9.28 (1H, s) 9.72 (1H, s)

製造例3: 4-ヒドロキシ-2-メチルフェニルベンズアミド

【0046】

【化11】



【0047】30ml ナスフラスコに4-アミノ-3-メチルフェノール (370mg, 3.00mmol) を入れ、アルゴン置換後乾燥DMFを1.3ml 加え溶解させた。次いで、乾燥トリエチルアミン0.42ml (1eq) を加えた。次いで、塩化ベンゾイル (0.35ml) の乾燥DMF溶液 (3.0ml) を加え、室温で12時間攪拌した。反応後、冷水50ml に反応溶液を注ぎ、吸引ろ過後、塩化メチレンで抽出し、水で洗浄

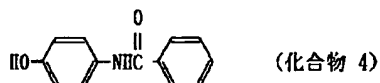
後、塩化メチレン層を硫酸ナトリウムで脱水し、塩化メチレンを減圧留去した。次いで、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル; 塩化メチレンで流出) 精製を行うと目的物の4-ヒドロキシ-2-メチルフェニルベンズアミドを400mg (収率60%) で得た。

【0048】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ 2.13 (3H, s) 6.60 (1H, dd, J=2.7 および 8.5) 6.66 (1H, d, J=2.7) 7.05 (1H, d, J=8.5) 7.45~7.60 (3H, m) 7.95 (2H, d, J=7.1) 9.25 (1H, s) 9.65 (1H, s)。

【0049】製造例4: 4-ヒドロキシフェニルベンズアミド

【0050】

【化12】



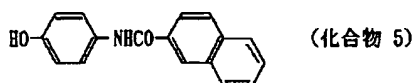
【0051】30ml ナスフラスコに4-アミノフェノール (328mg, 3.00mmol) を入れ、アルゴン置換後乾燥DMFを1.3ml 加え溶解させた。次いで、乾燥トリエチルアミン0.42ml (1eq) を加えた。次いで、塩化ベンゾイル (0.35ml) の乾燥DMF溶液 (3.0ml) を加え、室温で12時間攪拌した。反応後、冷水50ml に反応溶液を注ぎ、吸引ろ過後、塩化メチレンで抽出し、水で洗浄後、塩化メチレン層を硫酸ナトリウムで脱水し、塩化メチレンを減圧留去した。次いで、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル; 塩化メチレンで流出) 精製を行うと目的物の4-ヒドロキシフェニルベンズアミドを330mg (収率51.6%) で得た。

【0052】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ 6.72 (1H, d, J=2.2 および 9.1) 7.45~7.56 (5H, m) 7.92 (2H, d, J=2.2 および 7.8) 9.19 (1H, s) 9.98 (1H, s)。

【0053】製造例5: 4-ヒドロキシフェニル-2-ナフトイルアミド

【0054】

【化13】



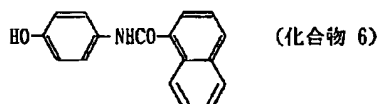
【0055】4-アミノフェノールとトリエチルアミンの混合DMF溶液に塩化2-ナフトイルを加え、室温で1.5時間撹拌した。各化合物の相対的使用量および生成物の精製は製造例4に従った。こうして、目的物の4-ヒドロキシフェニル-2-ナフトイルアミドを得た(収率33%)。

【0056】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ6.75 (1H, d, J=2.2 および 9.1) 7.55~7.65 (3H, m) 7.96~8.07 (4H, m) 8.53 (2H, d, J=2.2 および 7.8) 9.21 (1H, s) 10.17 (1H, s)。

【0057】製造例6: 4-ヒドロキシフェニル-1-ナフトイルアミド

【0058】

【化14】



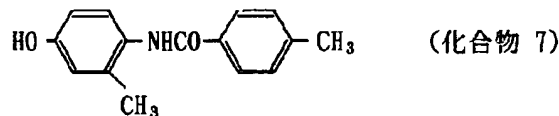
【0059】4-アミノフェノールとトリエチルアミンの混合DMF溶液に塩化1-ナフトイルを加え、室温で1時間撹拌した。各化合物の相対的使用量および生成物の精製は製造例4に従った。こうして、目的物の4-ヒドロキシフェニル-1-ナフトイルアミドを得た(収率28%)。

【0060】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ6.72 (1H, d, J=2.2 および 9.1) 7.54~7.71 (6H, m) 7.96~8.21 (3H, m) 9.15 (1H, s) 10.24 (1H, s)。

【0061】製造例7: 4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-4-メチルベンズアミド

【0062】

【化15】



【0063】4-アミノ-3-メチルフェノールとトリエチルアミンの混合DMF溶液に塩化4-メチルベンゾイルを加え、室温で30分撹拌した。各化合物の相対的使用量および生成物の精製は製造例4に従った。こうして、目的物の4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-4-メチルベンズアミドを得た(収率12%)。

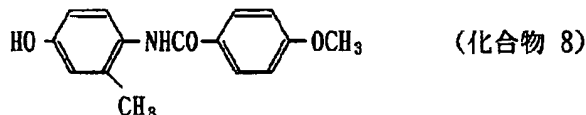
【0064】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ2.11 (3H,

s) 2.37 (3H, s) 6.55~6.65 (2H, m) 7.02 (1H, d, J=9.1) 7.29 (1H, d, J=9.1) 7.85 (1H, d, J=9.1) 9.24 (1H, s) 9.57 (1H, s)。

【0065】製造例8: 4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-4-メトキシベンズアミド

【0066】

【化16】



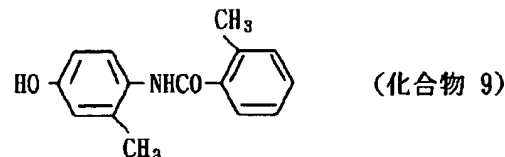
【0067】4-アミノ-3-メチルフェノールとトリエチルアミンの混合DMF溶液に塩化4-メトキシベンゾイルを加え、室温で5分撹拌した。各化合物の相対的使用量および生成物の精製は製造例4に従った。こうして、目的物の4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-4-メトキシベンズアミドを得た(収率16%)。

【0068】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ2.11 (3H, s) 3.83 (3H, s) 6.55~6.65 (2H, m) 7.02 (1H, dd, J=2.2 および 9.1) 7.93 (1H, dd, J=2.2 および 9.1) 9.23 (1H, s) 9.51 (1H, s)。

【0069】製造例9: 4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-2-メチルベンズアミド

【0070】

【化17】



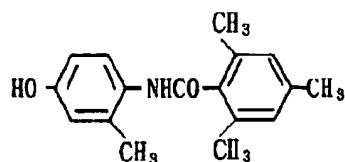
【0071】製造例3における塩化ベンゾイルに代え塩化2-メチルベンゾイルを使用したこと以外、製造例3に記載の方法を繰り返して標題の化合物を得た。

【0072】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ2.17 (3H, s) 2.41 (3H, s) 6.58 (1H, dd, J=8.3, 2.5) 6.64 (1H, d, J=2.5) 7.09 (1H, d, J=8.3), 7.22~7.40 (3H, m) 7.47 (1H, dd, J=7.2, 2.2) 9.24 (1H, s), 9.48 (1H, s)

製造例10: 4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル-2, 4, 6-トリメチルベンズアミド

【0073】

【化18】



(化合物 10)

【0074】製造例3における塩化ベンゾイルに代え塩化2,4,6-トリメチルベンゾイルを使用したこと以外、製造例3に記載の方法を繰り返して標題の化合物を得た。

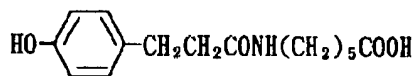
【0075】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (3H, s) 2.31 (3H, s) 2.42 (6H, s), 5.40 (1H, s), 6.67

(1H, d, J=6.5Hz), 6.70 (1H, s), 6.91 (2H, s), 6.99 (1H, s), 7.54 (1H, d, J=6.6)

製造例11: 6-{3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオンアミド}ヘキサン酸

【0076】

【化19】



(化合物 11)

【0077】(1) 3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸のヒドロキシル基のベンジルオキシカルボニル保護

50ml ナス型フラスコに3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸(200mg, 1.2mmol)を入れ、2規定の水酸化ナトリウム水溶液2.4mlとテトラヒドロフラン2.4mlの混合溶媒に溶解させる。次いで、ベンジルオキシカルボニルクロライド(0.34ml, 2.4mmol)を加え室温で2時間攪拌した。次いで、1規定塩酸を加え反応を終了させ、塩化メチレンで抽出し、カラム精製を行った。その結果、目的物を収率77%で得た。化合物は、¹H-NMRにより構造を確認した。

【0078】¹H-NMR (200MHz, CDCl₃) δ 2.67 (2H, t, J=7.0), 2.96 (2H, t, J=7.0) 5.26 (2H, s) 7.10 (2H, d, J=8.5) 7.22 (2H, d, J=8.6)

(2) 上記(1)で得られたベンジルオキシカルボニル(Cbz)保護化合物のスクシンイミジルエステル化 Cbz保護された3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸(100mg, 0.33mmol)を30ml ナス型フラスコに入れ、アルゴン置換した。次いで、0℃まで冷却した後、脱水塩化メチレンを2ml加え、完全に溶解した。次いで、脱水塩化メチレンと脱水アセトニトリル(2.2ml)に溶解したN-ヒドロキシスクシンイミド(41.8mg, 0.36mmol)を加えた。次いで、脱水塩化メチレン(0.41ml)に溶解したN,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド(81.7mg, 0.4mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。原料の消失をTLCで確認した後、吸引濾過し沈殿物を除き溶媒を減圧流去した。化合物は、非常に分解しやすいため、そのまま用いた。

【0079】(3) Cbz保護した6-{3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオンアミド}ヘキサンの合成 30ml ナス型フラスコに6-アミノヘキサン酸(130mg, 0.99mmol)をいれ、pH9.0の緩衝

液に溶解させ、次いで室温で、実施例2で合成した化合物(81.7mg)のテトラヒドロフラン溶液をすばやく全量加える。室温で2時間反応後、4規定塩酸水溶液を加え反応を終結させる。次いで酢酸エチルで抽出しカラム精製し、目的物を103mg(収率76%)で得た。化合物は、¹H-NMRにより構造を確認した。

【0080】¹H-NMR (200MHz, CDCl₃) δ 1.30 (2H, t, J=7.7), 1.44 (2H, t, J=7.7) 1.61 (2H, t, J=7.6) 2.95 (2H, t, J=7.4) 3.20 (2H, t, J=6.4) 5.26 (2H, s) 5.5 (1H, brs) 7.07 (2H, d, J=8.6) 7.21 (2H, d, J=8.5)

(4) 6-{3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオンアミド}ヘキサン酸の合成

30ml ナス型フラスコにCbz保護した4-ヒドロキシフェニルエチレンアミドヘキサン酸(103mg, 0.25mmol)とpalladium hydroxide on carbon(35mg)をいれ、脱水エタノール3mlに溶解した。次いで、水素ガスを添加し、添加し続けたまま室温で8時間反応させた。TLCにより原料の消失を確認した後吸引濾過した。得られた沈殿物を真空ポンプで乾燥すると目的物が69mg(収率98%)で得られた。化合物、¹H-NMRにより構造を確認した。

【0081】¹H-NMR (200MHz, DMSO-d₆) δ 1.21-1.52 (6H, m) 2.17 (2H, t, J=7.4) 2.25 (2H, t, J=7.4) 2.65 (2H, t, J=8.5) 2.99 (2H, q, J=5.8) 6.62 (2H, d, J=8.5) 6.95 (2H, d, J=8.5) 7.60-7.78 (1H, brs) 8.83-9.20 (1H, brs) 11.79-12.10 (1H, brs)

実施例: ヒト染色体のイン・サイチューハイブリダイゼーション

ヒト染色体標本にジゴキシゲニン標識したヒト全DNAプローブをハイブリダイズさせ、そのジゴキシゲニン標識したプローブにペルオキシダーゼ標識した抗ジゴキシゲニン抗体を結合させ、本発明に従う蛍光発生性基質(化合物1~11)および比較のために市販の水溶性蛍

光基質3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸 (HPPA)を反応させ、次いで生じた蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。ヒト全DNAプローブはヒト染色体全体にハイブリダイズするので、蛍光発生性基質がペルオキシダーゼと過酸化水素の反応系で蛍光色素に転化しておれば、蛍光顕微鏡下で染色体全体が蛍光を発して観察できる。

【0082】具体的な操作：ヒト末梢血リンパ球を培養し染色体標本作製した。また、プローブはヒト全DNAをニックトランスレーションによりジゴキシゲニン標識し、エタノール沈殿によりDNAを回収し、ホルムアミドに溶解して作製した。ヒト染色体標本を70℃に温めた変性溶液に2分間浸し、その後、4℃に冷やした70%エタノールに入れ、急冷し、2本鎖DNAを1本鎖に解離させた状態で保持した。プローブは、75℃のウォーターバスに10分間入れた後、氷水で5分間急冷し、2本鎖DNAを1本鎖に解離させた状態で保持した。このプローブをハイブリダイゼーション溶液と混ぜ、ヒト染色体標本にのせ、37℃で1晩反応させた(イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション)。

【0083】ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしていない余剰なプローブを洗い除くために、50%ホルムアミド/2xSSC溶液で37℃15分間洗浄し、続いて2xSSCで室温で15分間、4xSSCで室温で5分間洗浄した。次に、ペルオキシダーゼで標識した抗ジゴキシゲニン抗体を1%ブロッッキング溶液に100分の1希釈し、この酵素標識抗体溶液を標本にのせ、37℃で1時間静置した。プローブに結合しなかった余剰な酵素抗体を界面活性剤を含む洗浄溶液で洗い除いた。本発明に従う蛍光発生性基質(化合物1~11)と市販の水溶性蛍光基質HPPAを1mMの濃度になるように、0.01%の過酸化水素を含む反応溶液に溶解させ、この蛍光基質溶液を標本にのせ室温で30分間反応させた。蛍光発生性基質はプローブに結合したペルオキシダーゼと過酸化水素の反応系で新たな化合物を形成し、これらの化合物は、染色体に沈着し蛍光を発し、蛍光顕微鏡で観察することができた。

【0084】ヒト全DNAプローブは、染色体全体にハイブリダイズするため、蛍光発生性基質により染色体全体が染め出されることになる。蛍光基質(化合物1~11)と市販の水溶性蛍光基質HPPAを用いて反応させた標本を蛍光顕微鏡下で観察し、それぞれの蛍光強度及

び染色体への沈着性を調べた。

【0085】結果を表1に示す。なお、表中に示されている評価基準は次のとおりである。

+++：非常に強い

++：強い

+: 弱い

±：非常に弱い

-：検出されない

【0086】

【表1】

表1：染色体のイン・サイチュ・ハイブリダイゼーションにおける各蛍光発生性基質に関する特性

化合物	観 察		
	蛍光強度	沈着性	蛍光
比設 (HPPA)	±	+	緑
化合物 1	++	++	緑
化合物 2	+	++	緑
化合物 3	++	++	緑
化合物 4	+	++	緑
化合物 5	++	++*	緑
化合物 6	+	++	緑
化合物 7	++	++	緑
化合物 8	++	++	緑
化合物 9	++	++	緑
化合物10	++	++	緑
化合物11	+++	+++	緑

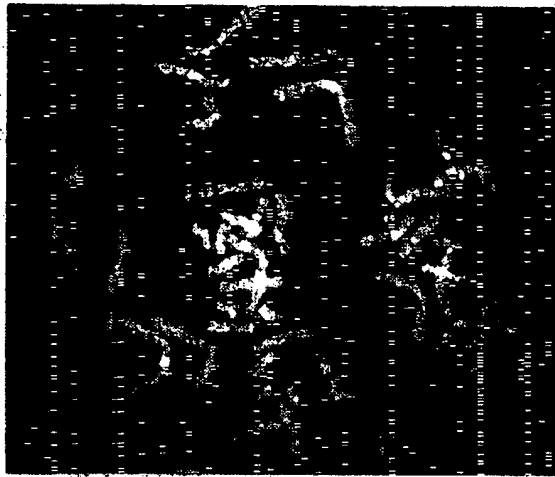
* ノイズが多い

【0087】比較のHPPAは、酵素反応後の生成物が水溶性であるためか、染色体に沈着せず、蛍光シグナルを検出することはできなかった。それに比べ、本発明に従う蛍光発生性基質は、どれも高い蛍光強度と、染色体に対する高い沈着性を持っており、特に化合物3、7、8および11において高い強度の蛍光シグナルが観察できた。図1は、化合物3による蛍光シグナルを蛍光顕微鏡で撮影したもので、緑色(写真上、白色)に染まる染色体が見て取れる。また、本発明に従う蛍光基質は、染色体だけでなく、組織にも沈着することができるので、組織における免疫染色にも応用することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト末梢血リンパ球(細胞)由来の染色体を化合物3を用いて処理して得られた蛍光シグナルの蛍光顕微鏡像の図面に代わる写真である。

【図1】



図面代用写真

フロントページの続き

(72)発明者 バイディ・イエラ・レディ
愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会
社アイシンコスモス研究所内

(72)発明者 融 健
愛知県愛知郡東郷町御岳2-18-19

BEST AVAILABLE COPY